

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-300887

(43)Date of publication of application : 15.10.2002

(51)Int.Cl. C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/12
C12P 13/14
// (C12N 1/21
C12R 1:15)
(C12N 1/21
C12R 1:13)
(C12N 9/12
C12R 1:15)
(C12N 9/12
C12R 1:13)
(C12P 13/14
C12R 1:15)
(C12P 13/14
C12R 1:13)

(21)Application number : 2001-162806

(71)Applicant : AJINOMOTO CO INC

(22)Date of filing : 30.05.2001

(72)Inventor : NAKAMURA JUN
MORIGUCHI KAYO
IZUI YUTAKA
KAWASHIMA NOBUKI
NAKAMATSU WATARU
KURAHASHI OSAMU

(30)Priority

Priority number : 2001028163 Priority date : 05.02.2001 Priority country : JP

(54) METHOD FOR PRODUCING L-GLUTAMINE BY FERMENTATION METHOD AND L-GLUTAMINE-PRODUCING BACTERIUM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve productivity and control the by-production of glutamic acid on the production of L-glutamine with a coryneform bacterium.

SOLUTION: This method for producing the L-glutamine comprises culturing in a culture medium a coryneform bacterium which has an L-glutamine- producing ability and in which the activity of a glutamine synthetase in a cell, preferably the activity of glutamic acid dehydrogenase, is reinforced, thus producing and accumulating the L-glutamine in the culture medium, and then collecting the L-glutamine.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-300887
(P2002-300887A)

(43) 公開日 平成14年10月15日 (2002. 10. 15)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 1/21	4 B 0 2 4
1/21		9/12	4 B 0 5 0
9/12		C 1 2 P 13/14	4 B 0 6 4
C 1 2 P 13/14		C 1 2 R 1: 15	4 B 0 6 5
// (C 1 2 N 1/21		1: 13	
審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 31 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-162806(P2001-162806)
(22) 出願日 平成13年5月30日 (2001. 5. 30)
(31) 優先権主張番号 特願2001-28163(P2001-28163)
(32) 優先日 平成13年2月5日 (2001. 2. 5)
(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000066
味の素株式会社
東京都中央区京橋1丁目15番1号
(72) 発明者 中村 純
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内
(72) 発明者 森口 嘉代
神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内
(74) 代理人 100089244
弁理士 遠山 勉 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 発酵法によるL-グルタミンの製造法及びL-グルタミン生産菌

(57) 【要約】

【課題】 コリネ型細菌を用いたL-グルタミンの生産において、生産性を向上させ、グルタミン酸の副生の抑制する。

【解決手段】 L-グルタミン生産能を有し、かつ細胞内のグルタミンシンテターゼ活性が増強され、好ましくはさらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が増強されたコリネ型細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することにより、L-グルタミンを製造する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-グルタミン生産能を有し、かつ細胞内のグルタミンシンターゼ活性が増強されたコリネ型細菌。

【請求項2】 グルタミンシンターゼ活性の増強が、グルタミンシンターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである請求項1記載の細菌。

【請求項3】 グルタミンシンターゼ活性の増強が、細胞内のグルタミンシンターゼのアデニル化による活性調節が解除されたことによるものである請求項1記載の細菌。

【請求項4】 細胞内のグルタミンシンターゼのアデニル化による活性調節の解除が、アデニル化による活性調節が解除されたグルタミンシンターゼを前記細菌に保持させること、前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ活性が低下したこと、又は前記細菌細胞内のPIIたんぱく質活性が低下したこと、のいずれか一つ又は2以上によるものである請求項3記載の細菌。

【請求項5】 さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された請求項1～4のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項6】 グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の増強が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである請求項5記載の細菌。

【請求項7】 請求項1～6いずれか一項に記載の細菌を培地に培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

【請求項8】 下記(A)または(B)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(A) 配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質。

(B) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質。

【請求項9】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項8記載のDNA。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイ

ブリダイズし、かつグルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

【請求項10】 下記(C)または(D)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質

(D) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質。

【請求項11】 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項10記載のDNA。

(c) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、コリネ型細菌のL-グルタミン生産菌およびL-グルタミンの製造法に関する。L-グルタミンは、調味料、肝機能促進薬、アミノ酸輸液、および総合アミノ酸製剤などの成分として、産業上有用なアミノ酸である。

【0002】

【従来の技術】発酵法によってL-アミノ酸を製造するには、微生物の育種改良法が多用されてきた。すなわち、野生株そのもののL-アミノ酸生産の生産能は極めて低い場合が多いので、突然変異により栄養要求性、アナログ耐性、もしくは代謝調節変異を付与したり、又はこれらを組み合わせる方法が知られている。上述の方法によれば、それなりの収量でL-グルタミンは得られるが、工業的に安価にL-グルタミンを製造する為には、さらに発酵収率を向上させることが不可欠である。

【0003】また、L-グルタミン発酵においては、L-グルタミン酸が副生するという問題がある。この問題を解決する方法が、例えば特開平3-232497号公報に提案されている。この方法によれば、ある程度L-グルタミン酸の生成を抑えることができるが、依然としてL-グルタミン酸の副生があると同時に、L-グルタミンの収量が不十分である。

【0004】上記のようなL-グルタミン生産菌の改良においては、変異処理剤などで宿主菌を処理し、ランダムに変異が入った菌からL-グルタミンの生産性が向上した株を選択する方策が用いられていたため、大きな労力と困難を伴っていた。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、コリネ型細菌のL-グルタミンの生産性向上、及びグルタミン酸の副生の抑制に至る特性を見出し、当該特性を有する菌株を用いたL-グルタミンの製造法を提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記問題点を解決すべく鋭意検討を行った結果、細胞中のグルタミンシンターゼ活性が増強されたコリネ型細菌の菌株が、該活性が野生株並である菌株に比べて、L-グルタミン生産能において優れていると同時に、L-グルタミン酸の副生が大幅に抑制できることを見出した。また、グルタミンシンターゼ活性とグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性を同時に増強させることにより、L-グルタミンの生産速度が向上することを見出した。さらに、新規なグルタミンシンターゼをコードする遺伝子、及びグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を単離することに成功し、本発明を完成するに至った。すなわち本発明は、以下の通りである。

【0007】(1) L-グルタミン生産能を有し、かつ細胞内のグルタミンシンターゼ活性が増強されたコリネ型細菌。

(2) グルタミンシンターゼ活性の増強が、グルタミンシンターゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである(1)記載の細菌。

(3) グルタミンシンターゼ活性の増強が、細胞内のグルタミンシンターゼのアデニル化による活性調節が解除されたことによるものである(1)記載の細菌。

(4) 細胞内のグルタミンシンターゼのアデニル化による活性調節の解除が、アデニル化による活性調節が解除されたグルタミンシンターゼを前記細菌に保持させること、前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ活性が低下したこと、又は前記細菌細胞内のPIIたんぱく質活性が低下したこと、のいずれか一つ又は2以上によるものである(3)記載の細菌。

(5) さらにグルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性が増強された(1)～(4)のいずれかに記載の細菌。

(6) グルタミン酸デヒドロゲナーゼ活性の増強が、グルタミン酸デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子のコピー数を高めること、又は前記細菌細胞内のグルタミンシンターゼをコードする遺伝子の発現が増強されるように同遺伝子の発現調節配列を改変することによるものである(5)記載の細菌。

【0008】(7) (1)～(6) いずれか一項に記載

の細菌を培地に接種し、該培地中に生成蓄積したL-グルタミンを採取することを特徴とするL-グルタミンの製造法。

【0009】(8) 下記(A)または(B)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(A) 配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質。

(B) 配列表配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質。

(9) 下記(a)又は(b)に示すDNAである(8)記載のDNA。

(a) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号659～1996からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

(10) 下記(C)または(D)に示すたんぱく質をコードするDNA。

(C) 配列番号3に記載のアミノ酸配列を有するたんぱく質

(D) 配列番号3に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質。

(11) 下記(c)又は(d)に示すDNAである(10)記載のDNA。

(c) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号2006～5200からなる塩基配列又は同塩基配列から調製され得るプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】(1) 本発明のコリネ型細菌

本発明において、「コリネ型細菌」とは、従来ブレヴィバクテリウム属に分類されていたが、現在コリネバクテリウム属に分類された細菌も含み(Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255(1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレヴィバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

【0012】コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム
 コリネバクテリウム・カルナエ
 コリネバクテリウム・グルタミカム
 コリネバクテリウム・リリウム
 コリネバクテリウム・メラセコーラ
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス
 コリネバクテリウム・ハーキュリス
 プレバクテリウム・ディバリカタム
 プレバクテリウム・フラバム
 プレバクテリウム・インマリオフィラム
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム
 プレバクテリウム・ロゼウム
 プレバクテリウム・サッカロリティカム
 プレバクテリウム・チオゲニタリス
 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス
 プレバクテリウム・アルバム
 プレバクテリウム・セリヌム
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス

【0013】具体的には、下記のような菌株を例示することができる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム ATCC13870
 コリネバクテリウム・アセトグルタミカム ATCC15806
 コリネバクテリウム・アルカノリティカム ATCC21511
 コリネバクテリウム・カルナエ ATCC15991
 コリネバクテリウム・グルタミカム ATCC13020, ATCC13032, ATCC13060
 コリネバクテリウム・リリウム ATCC15990
 コリネバクテリウム・メラセコーラ ATCC17965
 コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス AJ12340(FERM BP-1539)
 コリネバクテリウム・ハーキュリス ATCC13868
 プレバクテリウム・ディバリカタム ATCC14020
 プレバクテリウム・フラバム ATCC13826, ATCC14067, AJ12418(FERM BP-2205)
 プレバクテリウム・インマリオフィラム ATCC14068
 プレバクテリウム・ラクトファーメンタム ATCC13869
 プレバクテリウム・ロゼウム ATCC13825
 プレバクテリウム・サッカロリティカム ATCC14066
 プレバクテリウム・チオゲニタリス ATCC19240
 コリネバクテリウム・アンモニアゲネス ATCC6871, ATCC6872
 プレバクテリウム・アルバム ATCC15111
 プレバクテリウム・セリヌム ATCC15112
 ミクロバクテリウム・アンモニアフィラス ATCC15354

【0014】これら入手するには、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより分譲を受けることができる。すなわち、各菌株毎に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることができる。各菌株に対応する登録番号はアメリカ

ン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、AJ12340株は、1987年10月27日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター）（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）にFERM BP-1539の受託番号でブダベスト条約に基づいて寄託されている。また、AJ12418株は、1989年1月5日付けで通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にFERM BP-2205の受託番号でブダベスト条約に基づいて寄託されている。

【0015】本発明において、「L-グルタミン生産能」とは、本発明のコリネ型細菌を培養したときに、培地中にL-グルタミンを蓄積する能力をいう。このL-グルタミン生産能は、コリネ型細菌の野生株の性質として有するものであってもよく、育種によって付与または増強された性質であってもよい。

【0016】育種によってL-グルタミン生産能を付与または増強するには、6-ジアゾ-5-オキソ-ノルロイシン耐性を付与する方法（特開平3-232497）、プリンアナログ耐性および/またはメチオニンスルホキサイド耐性を付与する方法（特開昭61-202694）、 α -ケトマロン酸耐性を付与する方法（特開昭56-151495）、グルタミン酸を含有するペプチドに耐性を付与する方法（特開平2-186994）などが挙げられる。L-グルタミン生産能を有するコリネ型細菌の具体例としては、下記のような菌株が挙げられる。

【0017】プレバクテリウム・フラバムAJ11573(FERM P-5492) 特開昭56-151495公報参照
 プレバクテリウム・フラバムAJ12210(FERM P-8123) 特開昭61-202694公報参照
 プレバクテリウム・フラバムAJ12212(FERM P-8123) 特開昭61-202694公報参照
 プレバクテリウム・フラバムAJ12418(FERM-BP2205) 特開平2-186994公報参照
 プレバクテリウム・フラバムDH18(FERM P-11116) 特開平3-232497公報参照
 コリネバクテリウム・メラセコーラDH344(FERM P-11117) 特開平3-232497公報参照
 コリネバクテリウム・グルタミカムAJ11574(FERM P-5493) 特開昭56-151495公報参照

【0018】「細胞内のグルタミンシンテターゼ（以下、「GS」ともいう）活性が増強された」とは、細胞当たりのGS活性が野生型のコリネ型細菌のそれよりも高くなったことをいう。例えば、細胞当たりのGS分子の数が増加した場合や、GS分子当たりのGS活性が上昇した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばプレバクテリウム・フラバム ATCC14067である。細胞内のGS活性が増強された結果、培地中のL-グルタミン蓄積量が上昇するという効果や、L-グルタミン酸の副生が減少するという効果がある。

【0019】コリネ型細菌細胞内のGS活性の増強は、GSをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、GSをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをL-グルタミン生産能を有する宿主に導入して形質転換すればよい。また、野生型のコリネ型細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株にL-グルタミン生産能を付与してもよい。

【0020】GS遺伝子は、コリネ型細菌由来の遺伝子およびエシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。このうち、発現の容易さの観点からは、コリネ型細菌由来の遺伝子が好ましい。

【0021】コリネ型細菌のGSをコードする遺伝子として、既にglnAが明らかにされている(FEMS Microbiology Letters 81-88, (154) 1997)ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列表配列番号4および5に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌の染色体DNAを鋳型とするPCR法(PCR: polymerase chain reaction; White, T.J. et al., Trends Genet. 5, 185 (1989)参照)によって、GS遺伝子を取得することができる。他の微生物のGSをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。

【0022】染色体DNAは、DNA供与体である細菌から、例えば、斎藤、三浦の方法(H. Saito and K. Miura, Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963)、生物工学実験書、日本生物工学会編、97~98頁、培風館、1992年参照)等により調製することができる。

【0023】一方、アミノ酸合成系に関与する酵素にはアイソザイムが存在することが多い。本発明者らは、前述のglnA遺伝子の塩基配列との相同性を利用して、コリネ型細菌のGSのアイソザイムをコードする遺伝子の単離およびクローン化に成功した。この遺伝子を「glnA2」とする。その取得工程は後述する。glnA2も、glnAと同様に、コリネ型細菌のGS活性の増強に利用することができる。

【0024】PCR法により増幅されたGS遺伝子は、エシェリヒア・コリ及び/またはコリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターDNAに接続して組換えDNAを調製し、これをエシェリヒア・コリに導入しておく、後の操作がしやすくなる。エシェリヒア・コリ細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pUC19、pUC18、pHSG299、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pBR322、pACYC184、pMW219等が挙げられる。

【0025】コリネ型細菌で機能するベクターとは、例えばコリネ型細菌で自律複製できるプラスミドである。具体的に例示すれば、以下のものが挙げられる。

pAM330 特開昭58-67699号公報参照

pHM1519 特開昭58-77895号公報参照

pSPK6 特開2000-262288号公報参照

また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、前記エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。

【0026】このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をカッコ内に示した。

pAJ655 エシェリヒア・コリAJ11882(FERM BP-136)コリネバ クレウム・ゲルマニウムSR8201(ATCC39135)

pAJ1844 エシェリヒア・コリAJ11883(FERM BP-137)コリネバ クレウム・ゲルマニウムSR8202(ATCC39136)

pAJ611 エシェリヒア・コリAJ11884(FERM BP-138)

pAJ3148 コリネバ クレウム・ゲルマニウムSR8203(ATCC39137)

pAJ440 バチルス・ズブチリスAJ11901(FERM BP-140)

pHC4 エシェリヒア・コリAJ12617(FERM BP-3532)

【0027】これらのベクターは、寄託微生物から次のようにして得られる。対数増殖期に集められた細胞をリゾチーム及びSDSを用いて溶菌し、30000×gで遠心分離して溶解物から得た上澄液にポリエチレングリコールを添加し、セシウムクロライド-エチジウムブロマイド平衡密度勾配遠心分離により分別精製する。

【0028】GS遺伝子とコリネ型細菌で機能するベクターを連結して組換えDNAを調製するには、GS遺伝子の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結はT4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。

【0029】上記のように調製した組換えDNAをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリK-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法(Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970))があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法(Duncan, C.H., Wilson, G. A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977))がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法(Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978))も応用できる。また、コリネ型細菌の形質転換は、電気パルス法(杉本ら、特開平2-207791号公報)によっても行うことができる。

【0030】GS遺伝子のコピー数を高めることは、GS遺伝子をコリネ型細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。コリネ型細菌の染色体DNA上にGS遺伝子を多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペティティブDNA、転移因子の端部に存在するインパーテッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、GS遺伝子をトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。

【0031】GS活性の増強は、上記の遺伝子増幅による以外に、染色体DNA上またはプラスミド上のGS遺伝子のプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される。例えば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。また、国際公開W000/18935に開示されているように、GS遺伝子のプロモーター領域に数塩基の塩基置換を導入し、より強力なものに改変することも可能である。これらのプロモーター置換または改変によりGS遺伝子の発現が強化され、GS活性が増強される。これら発現調節配列の改変は、GS遺伝子のコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0032】発現調節配列の置換は、例えば後述の温度感受性プラスミドを用いた遺伝子置換と同様にして行うことができる。コリネ型細菌の温度感受性プラスミドとしては、p48K及びpSFKT2（以上、特開2000-262288号公報参照）、pHSC4（フランス特許公開1992年2667875号公報、特開平5-7491号公報参照）等が挙げられる。これらのプラスミドは、コリネ型細菌中で少なくとも25℃では自律複製することができるが、37℃では自律複製できない。後記実施例では、GDH遺伝子のプロモーター配列を置換する際にpSFKT2を用いたが、pSFKT2の代わりにpHSC4を用いて、同様にして遺伝子置換を行うことができる。pHSC4を保持するエシェリヒア・コリAJ12571は、1990年10月11日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（現独立行政法人 産業技術総合研究所 特許微生物寄託センター）（〒305-5466 日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6）に受託番号FERM P-11763として寄託され、1991年8月26日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-3524の受託番号で寄託されている。

【0033】GS活性の増強は、上記のようなGS遺伝子の発現量を増強する以外に、細胞内のGSのアデニル化による活性調節が解除されることによっても達成される。GSは、そのアミノ酸配列中のチロシン残基をアデニル化されることにより不活性型に変化する（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 642-649, (58) 1967）（J. Biol. Chem., 3769-3771, (243) 1968）。したがって、このGSのアデニル化を解除することによって、細胞内のGS活性を

増強することができる。ここで、アデニル化の解除とは、アデニル化が実質的に完全に解除されることに加えて、細胞内のGS活性が増強されるようにアデニル化が低減されることを含む。

【0034】GSのアデニル化は、一般にアデニルトランスフェラーゼによって行われる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1703-1710, (58) 1967）。コリネ型細菌においては、Genebank accession Y13221の配列に示されるglnA遺伝子産物の405位のチロシン残基がアデニル化されることが示唆されている（FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173) 1999）。このチロシン残基を他のアミノ酸残基に置換するようにglnA遺伝子に変異を導入することによってGSのアデニル化による不活性化を解除できる。

【0035】また、細胞内のグルタミンシンターゼ・アデニルトランスフェラーゼ（ATase）の活性を低下させることによっても、GSのアデニル化による不活性化を解除できる。コリネ型細菌のアデニルトランスフェラーゼは未知であったが、本発明者らは、コリネ型細菌のアデニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子glnEの単離に成功した。その工程については後述する。

【0036】コリネ型細菌の細胞内のATase活性を低下させるには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、ATase活性が低下した変異株を選択する方法が挙げられる。また、ATase活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、ATaseをコードする遺伝子（glnE）の部分配列を欠失し、正常に機能するATaseを産生しないように改変したglnE遺伝子（欠失型glnE）を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glnEと染色体上のglnEとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglnEを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立しており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

【0037】欠失型glnEを、宿主染色体上のglnEと置換するには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点と変異型glnEとクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換株が得られる。

【0038】こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するglnE配列との組換えを起こし、染色体glnEと欠失型glnEとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分（ベクター部分、温度感

受性複製起点及び薬剤耐性マーカー)を挟んだ状態で染色体に挿入されている。したがって、この状態では正常なglnEが優性であるので、形質転換株は正常なATaseを発現する。

【0039】次に、染色体DNA上に欠失型glnEのみを残すために、2個のglnEの組換えにより1コピーのglnEを、ベクター部分(温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカーを含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なglnEが染色体DNA上に残され、欠失型glnEが切り出される場合と、反対に欠失型glnEが染色体DNA上に残され、正常なglnEが切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のglnEは、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型glnEが残った株を選択することによって、glnEが破壊された株を取得することができる。

【0040】また、細胞内のPIIたんぱく質の活性を低下させることによって、GSのアデニル化による不活性化を解除できる。ATaseによるGSのアデニル化にはPIIたんぱく質も関与することが知られている。PIIたんぱく質とは、GS活性を調節するためのシグナル伝達たんぱく質であり、ウリジリルトランスフェラーゼ(UTase)によるウリジリル化を受けることが知られている。ウリジリル化されたPIIたんぱく質は、ATaseによるGSの脱アデニル化を促進し、脱ウリジリル化されたPIIたんぱく質はATaseによるGSのアデニル化を促進する。

【0041】UTaseの欠損株においてはGSが高度にアデニル化されることが報告されている(J. Bacteriology, 569-577, (134) 1978)。過剰にアデニル化されるこの表現形は、PIIたんぱく質の変異によって抑制される(J. Bacteriology, 816-822, (164) 1985)。すなわちPIIたんぱく質の活性低下によっても、GSのアデニル化による不活性化を解除できる。PIIたんぱく質の活性低下とは、ATaseによるアデニル化を促進する機能が低下することをいう。コリネ型細菌のPIIたんぱく質をコードするglnB遺伝子は既に単離されており、その欠失によりGSのアデニル化による抑制が解除されることが示唆されている(FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173) 1999)。

【0042】コリネ型細菌のPIIたんぱく質の活性を低下させるためには、例えば、コリネ型細菌を紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン(NTG)もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理し、PIIたんぱく質の活性が低下した菌株を選択する方法が挙げられる。また、PIIたんぱく質の活性が低下したコリネ型細菌は、変異処理の他に、PIIたんぱく質をコードする遺伝子glnBの部分配列

を欠失し、正常に機能するPIIたんぱく質を産生しないように改変したglnB遺伝子(欠失型glnB遺伝子)を含むDNAでコリネ型細菌を形質転換し、欠失型glnBと染色体上のglnBとの間で組換えを起こさせることにより、染色体上のglnBを破壊することができる。このような相同組換えを利用した遺伝子置換による遺伝子破壊は既に確立されており、直鎖DNAを用いる方法や温度感受性複製起点を含むプラスミドを用いる方法などがある。

【0043】欠失型glnBを宿主染色体上のglnBと置換するためには、例えば以下のようにすればよい。温度感受性複製起点と変異型glnEとクロラムフェニコール等の薬剤に耐性を示すマーカー遺伝子とを挿入して組換えDNAを調製し、この組換えDNAでコリネ型細菌を形質転換し、温度感受性複製起点が機能しない温度で形質転換株を培養し、続いてこれを薬剤を含む培地で培養することにより、組換えDNAが染色体DNAに組み込まれた形質転換体を得られる。

【0044】こうして染色体に組換えDNAが組み込まれた株は、染色体上にもともと存在するglnB配列との組換えを起こし、染色体glnBと欠失型glnBとの融合遺伝子2個が組換えDNAの他の部分(ベクター部分、温度感受性複製起点及び薬剤耐性マーカー)を挟んだ状態で染色体上に挿入されている。したがって、この状態では正常なglnBが優性であるので、形質転換体は正常なglnBを発現する。

【0045】次に、染色体DNA上に欠失型glnBのみを残すために、2個のglnBの組換えにより1コピーのglnBを、ベクター部分(温度感受性複製起点および薬剤耐性マーカーを含む)とともに染色体DNAから脱落させる。その際、正常なglnBが染色体上に残され、欠失型glnBが切り出される場合と、反対に欠失型glnBが染色体DNA上に残され、正常なglnBが切り出される場合がある。いずれの場合も、温度感受性複製起点が機能する温度で培養すれば、切り出されたDNAはプラスミド状態で細胞内に安定に保持される。次に、温度感受性複製起点が機能しない温度で培養すると、プラスミド上のglnBは、プラスミドとともに細胞から脱落する。そして、PCRまたはサザンハイブリダイゼーション等により、染色体上に欠失型glnBが残った株を選択することによって、glnBが破壊された株を取得することができる。

【0046】GSのアデニル化の解除は、上記のアデニル化を受けないようなGSの変異、ATaseの活性低下、及びPIIたんぱく質の活性低下から選ばれる2つ、又は3つの手段を組み合わせることによっても、達成することができる。

【0047】GS活性の増強は、上述のようなATaseによるGSのアデニル化の解除によっても可能であるが、前述のGS遺伝子のコピー数を高める手段や、発現調節配列の改変をする手段と組み合わせて行ってもよい。

【0048】本発明のコリネ型細菌を用いてL-グルタ

10

20

30

40

50

ミンを効率よく生産するには、GS活性と同時にグルタミン酸デヒドロゲナーゼ（以下、「GDH」ともいう）活性が高められた菌株を用いるのが好ましい。

【0049】「細胞内のGDH活性が増強された」とは、細胞当たりのGDH活性が野生型のコリネ型細菌のそれよりも高くなったことをいう。例えば、細胞当たりのGDH分子の数が増加した場合や、GDH分子当たりのGDH活性が上昇した場合などが該当する。また、比較対象となる野生型のコリネ型細菌とは、例えばプレビバクテリウム・フラバム ATCC14067である。細胞内のGDH活性が増強された結果、L-グルタミン生産能を有するコリネ型細菌の培養時間が短縮されるという効果がある。

【0050】コリネ型細菌細胞内のGDH活性の増強は、GDHをコードする遺伝子のコピー数を高めることによって達成される。例えば、GDHをコードする遺伝子断片を、該細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型のベクターと連結して組換えDNAを作製し、これをL-グルタミン生産能を有する宿主に導入して形質転換すればよい。また、野生型のコリネ型細菌に上記組換えDNAを導入して形質転換株を得、その後当該形質転換株にL-グルタミン生産能を付与してもよい。

【0051】GDHをコードする遺伝子は、コリネ型細菌の遺伝子を用いることも、エシェリヒア属細菌等の他の生物由来の遺伝子のいずれも使用することができる。発現容易の観点からは、コリネ型細菌由来の遺伝子を用いることが好ましい。

【0052】コリネ型細菌のGDHをコードする遺伝子（gdh遺伝子）の塩基配列は、既に明らかにされている（Molecular Microbiology (1992) 6 (3), 317-326）ので、その塩基配列に基づいて作製したプライマー、例えば配列表配列番号12及び13に示すプライマーを用いて、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCR法によって、gdh遺伝子を取得することができる。コリネ型細菌等の他の微生物のGDHをコードする遺伝子も、同様にして取得され得る。gdhのコリネ型細菌への導入は、前記のGS遺伝子と同様にして行うことができる。

【0053】また、本発明のコリネ型細菌は、GSおよびGDH以外のL-グルタミン生合成を触媒する酵素の活性が増強されていてもよい。例えばグルタミン生合成を触媒する酵素としては、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、アコニット酸ヒドラターゼ、クエン酸シンターゼ、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸カルボキシラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ等がある。

【0054】さらに、L-グルタミンの生合成経路から分岐してL-グルタミン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。このような反応を触媒する酵素としては、イソクエン酸リアーゼ、 α -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸シンターゼ等が挙げられる。

【0055】（2）本発明の微生物を用いたL-グルタミンの生産

上記のようにして得られるコリネ型細菌を培地で培養し、該培地中にL-グルタミンを生成蓄積せしめ、該培地からL-グルタミンを採取することにより、L-グルタミンを効率よく製造することができ、かつ、L-グルタミン酸の副生を抑制することができる。

【0056】本発明のコリネ型細菌を用いてL-グルタミンを生産するには、炭素源、窒素源、無機塩類、その他必要に応じてアミノ酸、ビタミン等の有機微量栄養素を含有する通常の培地を用いて常法により行うことができる。合成培地または天然培地のいずれも使用可能である。培地に使用される炭素源および窒素源は培養する菌株の利用可能であるものならばいずれの種類を用いてもよい。

【0057】炭素源としては、グルコース、グリセロール、フラクトース、スクロース、マルトース、マンノース、ガラクトース、澱粉加水分解物、糖蜜等の糖類が使用され、その他、酢酸、クエン酸等の有機酸、エタノール等のアルコール類も単独あるいは他の炭素源と併用して用いられる。

【0058】窒素源としては、アンモニア、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、塩化アンモニウム、りん酸アンモニウム、酢酸アンモニウム等のアンモニウム塩または硝酸塩等が使用される。

【0059】有機微量栄養素としては、アミノ酸、ビタミン、脂肪酸、核酸、更にこれらのものを含有するペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、大豆たん白分解物等が使用され、生育にアミノ酸などを要求する栄養要求性変異株を使用する場合には要求される栄養素を補添することが好ましい。

【0060】無機塩類としてはりん酸塩、マグネシウム塩、カルシウム塩、鉄塩、マンガン塩等が使用される。培養は、発酵温度20～45℃、pHを5～9に制御し、通気培養を行う。培養中にpHが下がる場合には、炭酸カルシウムを加えるか、アンモニアガス等のアルカリで中和する。かくして10時間～120時間程度培養することにより、培養液中に著量のL-グルタミンが蓄積される。

【0061】培養終了後の培養液からL-グルタミンを採取する方法は、公知の回収方法に従って行えばよい。例えば、培養液から菌体を除去した後に、濃縮晶析することによって採取される。

【0062】（3）本発明のグルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA（glnA2遺伝子）および、グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA（glnE遺伝子）

【0063】本発明の第一のDNAは、GSをコードする遺伝子である。また、本発明の第二のDNAは、ATaseをコードする遺伝子である。これらの遺伝子は、公知の

glnA遺伝子の部分断片をプローブとするハイブリダイゼーションによって、プレバクテリウム・ラクトファーマメンタムの染色体DNAライブラリーから取得することもできる。公知のglnA遺伝子の部分断片は、プレバクテリウム・ラクトファーマメンタム、例えばプレバクテリウム・ラクトファーマメンタムATCC13869株の染色体DNAを鋳型にして、配列番号18および19に示すプライマーを用いてPCR法によって増幅することによって取得される。

【0064】本発明のDNAの取得、及び、前記のGS活性及びGDH活性の増強に際して、ゲノムDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換等の方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1.21 (1989)に記載されている。

【0065】上記プライマーの塩基配列は、それぞれコリネバクテリウム・グルタミカムのglnA遺伝子 (GenBank ACCESSION Y13221) の塩基配列に基づいて設計されたものであり、これらのプライマーを用いれば、glnA遺伝子 (GenBank ACCESSION Y13221) の塩基番号1921~2282に相当する領域を含むDNA断片が得られる。

【0066】上記のようにして得られる本発明のglnA2を含むDNA断片の塩基配列及びこの配列がコードするアミノ酸配列の一例を配列番号1に示す。また、glnA2がコードするグルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質のアミノ酸配列のみを配列番号2に示す。

【0067】また、前記のDNA断片中には、glnA2遺伝子のORFのすぐ下流に別のORFが見出された。既知の配列との相同性比較の結果、当該ORFはグルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質 (ATase) をコードする遺伝子 (glnE) であると予想された。ATase活性を有するたんぱく質のアミノ酸配列のみを配列番号3に示す。

【0068】本発明のglnA2又はglnEを含むDNA断片は、本発明によりその塩基配列が明らかになったので、同塩基配列に基づいて作製したプライマーを用いたPCR法により、プレバクテリウム・ラクトファーマメンタムの染色体DNAから単離することができる。

【0069】本発明の第一のDNAは、コードされるたんぱく質のグルタミンシンターゼ活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むグルタミンシンターゼをコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のたんぱく質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には2から90個、好ましくは、2から50個、より好ましくは2から20個である。

【0070】本発明の第二のDNAは、コードされるたんぱく質のグルタミンシンターゼ・アデニリルトラン

スフェラーゼ活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むグルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするものであってもよい。ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のたんぱく質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、具体的には2から350個、好ましくは、2から50個、より好ましくは2から20個である。グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼの活性を損なう場合においても、相同組換えを起こす限り本発明に含まれる。

【0071】上記のようなGS又はATaseと実質的に同一のたんぱく質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように、glnA2又はglnEの塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、変異処理前のDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び変異処理前のDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0072】上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物の活性を調べることにより、グルタミンシンターゼ、または、グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼと実質的に同一のたんぱく質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するグルタミンシンターゼ、もしくは、グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち塩基番号659~1996または2066~5200からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、グルタミンシンターゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNA、または、グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を有するたんぱく質をコードするDNAを単離することによっても、GS又はATaseと実質的に同一のたんぱく質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDS

に相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0073】プローブとして、配列番号1の塩基配列の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、配列番号1の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、配列番号1の塩基配列を含むDNA断片を鋳型とするPCRによって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1%SDSが挙げられる。

【0074】上記のような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎグルタミンシンターゼ活性、または、グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性を、例えばグルタミンシンターゼ活性についてはMethods in Enzymology, Vol. XVIIA, 910-915, ACADEMIC PRESS (1970)記載の方法で、グルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼ活性についてはMethods in Enzymology Vol. XVIIA, 922-923, ACADEMIC PRESS (1970)記載の方法で、それぞれ測定することによって、容易に選別することができる。活性が低下あるいは欠失したグルタミンシンターゼ・アデニリルトランスフェラーゼをコードするDNAも本発明においては利用可能である。

【0075】GSと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAとして具体的には、配列番号2に示すアミノ酸配列と、好ましくは80%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有し、かつGS活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。また、ATaseと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAとして具体的には、配列番号3に示すアミノ酸配列と、好ましくは65%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有し、かつATase活性を有するタンパク質をコードするDNAが挙げられる。

【0076】

【実施例】以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

【0077】

【実施例1】GS遺伝子増幅株の評価

(1) コリネ型細菌のglnA遺伝子のクローニング
コリネバクテリウム・グルタミカムのglnA配列は既に明らかにされている(FEMS Microbiology Letters 81-88, (154) 1997)。報告されている塩基配列に基づいて、配列表配列番号4および5に示すプライマーを合成し、プレバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型にしてPCR法によりglnA断片を増幅した。

【0078】プレバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAの調製は、Bacterial Genome DNA Purific

ation Kit(Advanced Genetic Technologies Corp.)を用いて行った。また、PCR反応は、Pyrobest DNA Polymerase (宝酒造)を用い、変性94℃ 30秒、会合55℃ 15秒、伸長72℃ 2分の条件で30サイクル行った。

【0079】生成したPCR産物を常法により精製後、制限酵素SalIで切断し、SalIで切断したpMW219 (ニッポンジーン)とライゲーションキット (宝酒造)を用いて連結した後、エシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル (宝酒造)を形質転換し、IPTG 10μg/ml、X-Gal 40μg/mlおよびカナマイシン25μg/mlを含むL培地に塗布し、一晚培養した。その後、出現した白色のコロニーを釣り上げ、単コロニー分離し、形質転換体を得た。

【0080】形質転換体からアルカリ法によりプラスミドを調製した後、ベクターにglnA遺伝子が挿入されているプラスミドをpMW219GSと名付けた。

【0081】(2) glnAとコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドの構築

さらに、glnA遺伝子とコリネ型細菌の複製起点を有するプラスミドを構築するために、既に取得されているコリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984))由来の複製起点を持つプラスミドpHK4 (特開平5-7491号公報参照)を制限酵素BamHIおよびKpnIで消化して、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片をDNA平滑末端化キット (宝酒造)を用い平滑末端化した後、KpnIリンカー (宝酒造)を用いてpMW219GSのKpnI部位に挿入した。本プラスミドをpGSと名付けた。

【0082】(3) コリネ型細菌へのpGSの導入と培養評価

30 L-グルタミン生産菌プレバクテリウム・フラバムAJ12418 (FERM BP-2205: 特開平2-186994号公報参照)を電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照)によりプラスミドpGSで形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体AJ12418/pGSを用いてL-グルタミン生産のための培養を以下に行った。

【0083】25μg/mlのカナマイシンを含むCM2Bプレート培地に培養して得たAJ12418/pGS株の菌体を、グルコース100g、(NH₄)₂SO₄ 60g、KH₂PO₄ 2.5g、MgSO₄・7H₂O 0.4g、FeSO₄・7H₂O 0.01g、VB₁-HCl 350μg、ビオチン4μg、大豆加水分解物200mg、CaCO₃ 50gを純水1Lを含む培地 (NaOHでpH6.8に調整されている)に接種し、31.5℃にて培地中の糖が消費されるまでしんとう培養した。

【0084】培養終了後、培養液中のL-グルタミン蓄積量は、培養液を適当に希釈した後、液体クロマトグラフィーにより分析した。カラムはCAPCELL PAK C18 (資生堂)を用い、サンプルは0.095%リン酸、3.3mMヘプタンスルホン酸、5%アセトニトリルを蒸留水1Lを含む溶離液で溶出し、210nmの吸光度の変化によりL-グルタミン蓄積量を分析した。このときの結果を表1に示した。

【0085】

* * 【表1】

表1

菌株	L-Gln(g/L)	L-Glu(g/L)	培養時間(hr)
AJ12418	38.4	0.7	70
AJ12418/pGS	45.1	0.02	82

【0086】pGS導入株ではL-グルタミン (L-Gln) の蓄積が顕著に向上し、またL-グルタミン酸 (L-Glu) の副生が大幅に抑制された。これらの結果から、L-グルタミンの生産において、GSの増強が収量の向上に有効であることが示された。なお、GSの酵素活性のデータは、実施例2の表2に示した。

【0087】

【実施例2】GSアデニル化部位改変株の評価

(1) アデニル化部位改変プラスミドの構築

コリネ型細菌のglnA遺伝子産物のアデニル化部位は、既に明らかにされている (FEMS Microbiology Letters, 303-310, (173)1999)。そこで、アデニル化部位が改変されたglnA遺伝子で、染色体上のglnA遺伝子とを置換することにより、アデニル化部位改変株の取得を行った。具体的な方法を以下に記す。

【0088】まずプレバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列表配列番号6と7の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnA遺伝子N末端側の増幅産物を得た。一方、glnA遺伝子C末端側の増幅産物を得るために、プレバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列表配列番号8と9の合成DNAをプライマーとしてPCRを行った。配列表配列番号7と8にはミスマッチが導入されているので、これらの増幅産物の末端には変異が導入される。次に、変異が導入されたglnA遺伝子断片を得るために、上記glnA N末側およびC末側の遺伝子産物を、それぞれほぼ等モルとなるように混合し、これを鋳型として配列表※

表2

菌株	L-Gln(g/L)	GS活性(U/mg)	培養時間(hr)
AJ12418	39.0	0.030	70
AJ12418/pGS	46.1	0.067	81
QA-1	44.3	0.040	72

【0092】QA-1株ではAJ12418に比べ、L-グルタミン蓄積の向上が認められた。これらの株のGS活性について測定した結果についても、表2に示した。GS活性は、Journal of Fermentation and Bioengineering, Vol.70, No.3, 182-184, 1990に記載の方法を参考とし、イミダゾール-HCl (pH7.0)100mM, NH₄Cl 0.1mM, MnCl₂ 1mM, ホスホエノールピルビン酸1mM, NADH 0.3mM, ラクテ

※配列番号10と11の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、アデニル化部位に変異導入されたglnA遺伝子増幅産物を得た。生成したPCR産物を常法により精製後、HincIIで消化し、pHSG299 (宝酒造) のHincII部位に挿入した。このプラスミドをpGSAと名付けた。

【0089】(2) アデニル化部位改変株の構築と培養評価

上述のpGSAは、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まないため、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた株が形質転換体として出現する。

【0090】L-グルタミン生産菌プレバクテリウム・フラバムAJ12418を電気パルス法 (特開平2-207791号公報参照) により高濃度のプラスミドpGSAを用いて形質転換し、カナマイシン耐性を指標として形質転換体を得た。次にこれらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。さらに、カナマイシン感受性株のglnA遺伝子の配列を決定し、その配列中のアデニル化部位がpGSA由来のglnAのその領域と置換されたものをQA-1と名付けた。AJ12418、AJ12418/pGS、QA-1株を用いて、L-グルタミン生産のための培養を実施例1 (3) 記載の方法と同様にして行った。その結果を表2に示した。

【0091】

【表2】

トデヒドロゲナーゼ10U, ピルビン酸キナーゼ25U, ATP 1mM, MSG 10mMを含む溶液に、粗酵素液を加え、30℃における340nmの吸光度変化を測定することによって測定した。ブランクの測定には、上記反応液よりMSGを除いたものを用いた。粗酵素液は、上記の培養液より遠心分離により菌体を分離し、イミダゾール-HCl (pH7.0)100mMで洗浄後、超音波破碎し、未破碎菌体を遠心分離で除去

することにより、調製した。粗酵素液のたんぱく質濃度は、牛血清アルブミンを標準試料として、ProteinAssay (Bio-Rad) を用いて定量した。

【0093】

【実施例3】GDH遺伝子増幅株の評価

(1) gdh増幅株の構築と培養評価

コリネ型細菌のgdh遺伝子がクローニングされたプラスミドpGDHの構築は、以下のように行った。まずブレバクテリウム・ラクトファーマメンタムATCC13869株の染色体DNAを抽出し、これを鋳型として、配列表配列番号12と13の合成DNAをプライマーとしてPCR反応を行った。得られたDNA断片を平滑末端化し、これをpHSG399 (宝酒造) のSmaI部位に挿入した。このプラスミドをpHSG399GDHと名付けた。

【0094】次に、pHSG399GDHのSalI部位に、コリネ型細菌で自律複製可能なプラスミドpHM1519(Agric. Biol.*

表3

菌株	L-Gln(g/L)	L-Glu(g/L)	培養時間(hr)
AJ12418	38.8	0.7	70
AJ12418/pGDH	29.5	12.0	55

【0097】

【実施例4】GSおよびGDHを同時に増強した株の構築と評価

(1) gdhプロモーター改変プラスミドの構築

ブレバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを抽出し、これを鋳型として、配列表配列番号14と15の合成DNAをプライマーとしてPCR反応を行った。得られたDNA断片を制限酵素StuI、PvuIIで切断し、これをpHSG399のSmaI部位に挿入した。このプラスミドを制限酵素SacIで処理することによりgdhプロモーターおよびgdh遺伝子の部分断片を含むDNA断片を取得し、pKF19k (宝酒造) のSacI部位に挿入した。このプラスミドをpKF19GDHと名付けた。

【0098】プロモーター領域への変異の導入には、Mutan-Super Express Km (宝酒造) を用いた。pKF19GDHを鋳型として、Mutan-super Express Km添付のセレクションプライマーと変異導入用のプライマーとして配列表配列番号16又は17の5'末端リン酸化合成DNAを添加して、LA-PCRを行った。反応産物はエタノール沈殿により精製した後、これを用いてエシェリヒア・コリJM109のコンピテントセル (宝酒造) を形質転換し、形質転換体※

表4

プラスミド	gdhプロモーター配列
pKF19GDH	TGGTCAtatctgtgcgacgtgcCATAAT (配列番号20)
pKF19GDH1	TGGTCAtatctgtgcgacgtgcTATAAT (配列番号21)

* Chem., 48, 2901-2903 (1984))由来の複製起点を導入した。具体的には、前述のpHK4を制限酵素BamHIおよびKpnIで消化して、複製起点を含む遺伝子断片を取得し、得られた断片を平滑末端化した後、SalIリンカー (宝酒造) を用いてpHSG399GDHのSalI部位に挿入した。本プラスミドをpGDHと名付けた。

【0095】L-グルタミン生産菌ブレバクテリウム・フラバムAJ12418株をpGDHで形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体AJ12418/pGDHを用いて、L-グルタミン生産のための培養を実施例1記載の方法で行った。その結果を表3に示した。GDH増強株ではL-グルタミンの収量が減少し、L-グルタミン酸の副生が増加したが、培養時間は大幅に短縮された。

【0096】

【表3】

※を得た。

【0099】形質転換体よりプラスミドを抽出し、gdhプロモーター領域の配列を決定した。このうち、表4に示す配列を有していたものを、pKF19GDH1、pKF19GDH4と命名した。gdhプロモーター配列をpKF19GDH1型に置換することにより、GDH活性は野生型のプロモーターを有するgdhに比べ約3倍、pKF19GDH4型に置換することによりGDH活性は約5倍に向上させることができると予想される (国際公開W000/18935参照)。

【0100】これらのプラスミドを制限酵素SacIで切断し、gdhプロモーターおよびgdh遺伝子の部分断片を含むDNA断片を取得し、pSFKT2 (特開2000-262288号公報参照) のSacI部位に挿入した。これらのプラスミドを、それぞれpSFKTGDH1、pSFKTGDH4と名付けた。pSFKT2は、ブレバクテリウム・ラクトファーマメンタムATCC13869株由来のプラスミドpAM330の誘導体であり、コリネ型細菌中での自律複製が温度感受性となっているプラスミドである。

【0101】

【表4】

【0102】(2) gdhプロモーター変異の染色体への導入
染色体上のgdhプロモーター配列への変異の導入は、以下のようにして行った。まず、QA-1株を電気パルス法によりプラスミドpSFKTGDH1、pSFKTGDH4で形質転換し、それぞれ形質転換体を得た。なお、形質転換後の培養は25℃で行った。次に、これらの形質転換体を34℃で培養し、34℃においてカナマイシン耐性を示す株を選択した。上記プラスミドは34℃では自律複製できないために、相同組換えにより、染色体にこれらのプラスミドが組み込まれたもののみが、カナマイシン耐性を示す。さらに、これらのプラスミドが染色体上に組み込まれた株をカナマイシン非存在下で培養し、カナマイシン感受性となった株を選択し、そのうち染色体上のgdhプロモーター領域にpSFKTGDH1、pSFKTGDH4と同じ変異が導入された株をそれぞれQB-1、QB-4と命名した。

【0103】(3) gdh遺伝子増幅株の構築とGDH活性の測定

L-グルタミン生産菌プレバクテリウム・フラバムQA-1株を、実施例3(2)記載のプラスミドpGDHで形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体QA-1/pGDHを用いてL-グルタミン生産のための培養を実施例1 *

*記載の方法で行った。また、GDH活性についてはMol. Microbiology, 317-326(6) 1992を参考とし、Tris-HCl(pH 7.5)100mM, NH₄Cl 20mM, α-ケトグルタル酸10mM, NADPH 0.25mMを含む溶液に粗酵素液を加え、340nmにおける吸光度の変化を測定することによって測定した。粗酵素液は、上記の培養液より遠心分離により菌体を分離し、Tris-HCl(pH7.5)100mMで洗浄後、超音波破碎し、未破碎菌体を遠心分離で除去することにより調製した。粗酵素液のたん白質濃度は牛血清アルブミンを標準試料として、Protein Assay (Bio-Rad) を用いて定量した。その結果を表5に示した。

【0104】L-グルタミンの収量においては、GDHプロモーター改変株QB-1、QB-4が高い収量を示した。また、QA-1/pGDH株も、AJ12418株よりも高い収量を示した。培養時間は、QA-1/pGDH株が最も短かった。L-グルタミン酸の副生は、QB-1、QB-4株が大幅に改善された。これらの結果から、GSとGDHを同時に強化することが、L-グルタミンの収量の向上および培養時間短縮に有効であることが示された。

【0105】

【表5】

表5

菌株	L-Gln(g/L)	L-Glu(g/L)	培養時間(hr)	GDH活性(U/mg)
AJ12418	40.5	0.8	68	1.6
QA-1/pGDH	47.9	1.0	60	15.2
QB-1	50.5	0.1	65	4.1
QB-4	50.0	0.3	65	9.6

【0106】

【実施例5】GSのアイソザイムをコードする遺伝子の取得

コリネバクテリウム・グルタミカムのglnAを取得したことを報告した論文(FEMS Microbiol. Letter, 154 (1997) 81-88)には、ΔglnA破壊株がグルタミン要求となり、GS活性が失われることを記載されている一方、サザンブロッティングの結果、アイソザイムの存在を示唆するデータも報告されている。また、「アミノ酸発酵：学会出版センター、232頁～235頁」には、コリネバクテリウム・グルタミカムには2種類のGSがあることが記載されている。そこで第2のGSアイソザイムをコードする遺伝子の取得を試みた。

(1) プロープの調製

GSのアイソザイムをコードする遺伝子(glnA2)は、コロニーハイブリダイゼーションにより取得した。まず、配列表配列番号18および19に示すプライマーを用い

て、プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行い、glnA遺伝子部分断片を取得した。このDNA断片をDIG-ハイプライムDNAラベリング&デテクションスターターキットI(ペーリンガー・マンハイム)を用いて標識し、プローブとした。

【0107】(2) コロニーハイブリダイゼーション
プレバクテリウム・ラクトファーメンタムATCC13869株の染色体DNAを抽出し、制限酵素Sau3AIにより部分分解して、得られたDNA断片をpHSG299のベクターのBamHI部位に挿入し大腸菌JM109株を形質転換した。得られた形質転換体を、Hybond-N+ (アマシャムファルマシアバイオテック) にトランスファーし、変性、中和後、DIG-ハイプライムDNAラベリング&デテクションスターターキットIにしたがって、実施例5(1)で調製したプローブとハイブリダイズさせた。このとき、強くハイブリダイズする形質転換体と弱くハイブリダイズする形質

転換体が認められた。これらの形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、挿入断片の塩基配列を決定したところ、既知のコリネ型細菌のグルタミンシンターゼと高い相同性を示す遺伝子を含むクローンが取得できた。後者の挿入断片の全塩基配列を配列表配列番号1に示した。

【0108】オープン・リーディング・フレームを推定し、その塩基配列より推定される産物のアミノ酸配列を配列表配列番号2と3に示した。これらのアミノ酸配列のおおのについて既知の配列と相同性比較を行った。用いたデータベースはGenbankである。その結果、いずれのオープン・リーディング・フレームにコードされるアミノ酸配列も、コリネ型細菌の新規なたんぱく質であることが明らかとなった。塩基配列及びアミノ酸配列は、Genetyx-Mac computer program (ソフトウェア開発、東京)により解析した。相同性解析は、LipmanとPearson (Science, 227,1435-1441, 1985)の方法にしたがって行った。

【0109】配列表配列番号2に示したアミノ酸配列は、既に報告されているコリネバクテリウム・グルタミ*20

表6

菌株	遺伝子名	アミノ酸数	相同性
Brevibacterium lactofermentum	glnA2	446A.A	—.
Corynebacterium glutamicum	glnA	478A.A	34.6%
Mycobacterium tuberculosis	glnA2	446A.A	65.6%
Streptomyces coelicolor	glnA	453A.A	60.0%

【0112】

※30※【表7】

表7

菌株	遺伝子名	アミノ酸数	相同性
Brevibacterium lactofermentum	glnE	1045A.A	—.
Mycobacterium tuberculosis	glnE	994A.A	51.9%
Streptomyces coelicolor	glnE	784A.A	33.4%

【0113】

【実施例6】ATase欠損株によるL-グルタミンの生産
上記実施例5でATaseをコードする遺伝子glnEが明らかにされたので、L-グルタミン生産菌AJ12418よりglnE欠損株を構築した。具体的方法を以下に示す。まず、ブレバクテリウム・フラバムATCC14067株の染色体DNAを鋳型として、配列表番号23と24の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnE遺伝子の部分断片を得た。生成したPCR産物を常法により精製後、平滑末端化し、pHS G299 (宝酒造)のHincII部位に挿入した。このプラスミドをpGLNEと名付けた。次に、このプラスミド上のglnE遺伝子の一部領域を欠失させる為、pGLNEをHincIIで消

*カムのGS (FEMS Microbiology Letters 81-88,(154) 1997)、マイコバクテリウム・ツバクロシスのGS (GenBank ACCESSION Z70692) およびストレプトマイセス・セリカラーのGS (GenBank ACCESSION AL136500)と、それぞれ34.6%、65.6%、60%の相同性を示し(表6)、コリネ型細菌のGSのアイソザイムであることが判明した。

【0110】一方、配列表配列番号3の配列は、既に報告されているマイコバクテリウム・ツバクロシスのATase (GenBank ACCESSION Z70692) およびストレプトマイセス・セリカラーのATase (GenBank ACCESSION Y17736)と、それぞれ51.9%、33.4%の相同性を示し(表7)、コリネ型細菌のATaseであることが判明した。したがって、配列表番号1に示す塩基配列のうち、配列表番号2に示すアミノ酸配列をコードするオープン・リーディング・フレームはglnA2であり、配列表番号3に示すアミノ酸配列をコードするオープン・リーディング・フレームはglnEであることが判明した。

【0111】

【表6】

化した後、セルフライゲーションを行い、得られたプラスミドをpΔGLNEと名付けた。このプラスミドは、配列表配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号2341番目から4650番目までを含んでいるが、3343番目のHincII認識部位から3659番目のHincII認識部位までの約300bpを欠失している。

【0114】上述のpΔGLNEは、コリネ型細菌の細胞内で自律複製可能とする領域を含まない為、本プラスミドでコリネ型細菌を形質転換した場合、極めて低頻度であるが、本プラスミドが相同組換えにより染色体に組み込まれた形が形質転換体として出現する。

【0115】L-グルタミン生産菌ブレバクテリウム

・フラバムAJ12418を電気パルス法により、高濃度のプラスミドpΔGLNEを用いて形質転換し、カナマイシン耐性を指標として形質転換体を取得した。次にこれらの形質転換体を継代培養し、カナマイシン感受性となった株を取得した。取得したカナマイシン感受性株より染色体DNAを抽出し、これを鋳型として配列番号23と24の合成DNAをプライマーとしてPCRを行い、glnE遺伝子の部分断片を得た。PCR産物をHincIIで消化し、約300bpの断片が生じないものをglnE遺伝子破壊株とした。この株をQA-Tと名付けた。AJ12418及びQA-Tを用いて、L-グル *10

表8

菌株	L-Gln(g/L)	GS活性(U/mg)	培養時間(hr)
AJ12418	39.0	0.03	70
QA-T	45.1	0.05	75

【0118】〔配列表の説明〕

配列番号1：glnA2およびglnE塩基配列

配列番号2：glnA2アミノ酸配列

配列番号3：glnEアミノ酸配列

配列番号4：glnA増幅用プライマーN

配列番号5：glnA増幅用プライマーC

配列番号6：glnA 1stPCRプライマーNN

配列番号7：glnA 1stPCRプライマーNC

配列番号8：glnA 1stPCRプライマーCN

配列番号9：glnA 1stPCRプライマーCC

配列番号10：glnA 2ndPCRプライマーN

配列番号11：glnA 2ndPCRプライマーC

配列番号12：gdh増幅用プライマーN

配列番号13：gdh増幅用プライマーC

配列番号14：gdh増幅用プライマーN2

配列番号15：gdh増幅用プライマーC2

配列番号16：gdhプロモーター変異プライマーM1 ※

* タミン生産の為の培養を実施例1（3）記載の方法と同様に行った。その結果を表8に示した。

【0116】QA-T株ではAJ12418株に比べ、L-グルタミン蓄積の向上が認められた。これらの株のGS活性について測定した結果についても表8に示した。QA-T株ではAJ12418株に比べ、GS活性が向上していることが確認された。

【0117】

【表8】

※配列番号17：gdhプロモーター変異プライマーM4

配列番号18：glnAプローブ調製用プライマーN

20 配列番号19：glnAプローブ調製用プライマーC

配列番号20：野生型gdhプロモーター配列

配列番号21：変異型gdhプロモーター配列

配列番号22：変異型gdhプロモーター配列

配列番号23：glnE破壊用プライマーN

配列番号24：glnE破壊用プライマーC

【0119】

【発明の効果】本発明によれば、コリネ型細菌を用いた発酵法によるL-グルタミンの製造において、L-グルタミン酸の副生を抑制でき、L-グルタミンの生産効率を向上させることができる。また、本発明のDNAは、コリネ型細菌のL-グルタミン生産菌の育種に利用することができる。

【0120】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc.

<120> 発酵法によるL-グルタミンの製造法及びL-グルタミン生産菌

<130> P-8706

<140>

<141> 2001-05-30

<150> JP 2001-28163

<151> 2001-02-05

<160> 24

<170> PatentIn version 3.0

【0121】

<210> 1

<211> 5500

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (659)..(1996)

<220>

<221> CDS

<222> (2006)..(5200)

<400> 1

gacagtgct tcggcttctt cticgaagtt ggtggactct gcccttttca aaagtgcggt	60
gatacgaiga tgcgctltgg cctglgccgg ggtcaltggg ctgggtgtcti gattglctaa	120
ggcgtggagc tctgcgagca ttgccagtc aggcaaggta cttagcttcg gtagctcggg	180
gagaatcttc tccagggica tcaccggcaa gtggctagtt tcggcggcac gcgttccgtt	240
cacccacapt gtgtacatct catcggagca ggaglaagca atctcaggta gcgcgtgaaa	300
caggagtggg tcaatatcgg cggaaaactc atggcggaga tcggcgggag tccaccacg	360
aagcgcacag aaacctaggt ggctgatgat gctllcttct aaaatctgac ggtaagagtc	420
tlglcgtcg glgacglgt cggagaaglg ggagagggtc attgcggttt ccttattcgt	480
aggagagttc taatttcggt gcggttctca gtgaaccacc caagciggac acctcccacc	540
cccgtgtcat caaaaaaccg cgacatcctt gagtaactct gagaactact acccccgatg	600
cgagtataaa agtggcaaat gcgcagtcga tgtcccatcg ctgcgtagat tagttttc	658
atg aac agc gaa cag gaa ttt gta ctg agc gcc att gaa gaa cgc gac	706
Met Asn Ser Glu Gln Glu Phe Val Leu Ser Ala Ile Glu Glu Arg Asp	
1 5 10 15	
att aag ttt gtg cgt cta tgg ttc act gac att ctt gga cac ttg aag	754
Ile Lys Phe Val Arg Leu Trp Phe Thr Asp Ile Leu Gly His Leu Lys	
20 25 30	
tca gtg gtt gtg gct cct gca gaa cta gag tct gcg ttg gaa gaa ggc	802
Ser Val Val Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ala Leu Glu Glu Gly	
35 40 45	
atc gga ttc gat ggc tca gcc att gag ggc tac gcg cgt atc tcg gaa	850
Ile Gly Phe Asp Gly Ser Ala Ile Glu Gly Tyr Ala Arg Ile Ser Glu	
50 55 60	
gcg gac acc att gcc cgc cca gat cca tcg aca ttc cag gtc ctg cca	898
Ala Asp Thr Ile Ala Arg Pro Asp Pro Ser Thr Phe Gln Val Leu Pro	
65 70 75 80	
cta gaa gcg ggc atc tca aaa ctg cag gca gca cgc ctg ttt tgc gat	946
Leu Glu Ala Gly Ile Ser Lys Leu Gln Ala Ala Arg Leu Phe Cys Asp	
85 90 95	
gtc acg atg ccg gac gga cag cca tct ttt tct gac ccg cgc caa gtg	994
Val Thr Met Pro Asp Gly Gln Pro Ser Phe Ser Asp Pro Arg Gln Val	
100 105 110	
ctg cgc agg cag gtc caa cta gct gca gat gaa ggc ttg acc tgc atg	1042
Leu Arg Arg Gln Val Gln Leu Ala Ala Asp Glu Gly Leu Thr Cys Met	
115 120 125	
atc tca cca gag att gag ttc tat ttg gtg caa agc ctt cgc acc aac	1090
Ile Ser Pro Glu Ile Glu Phe Tyr Leu Val Gln Ser Leu Arg Thr Asn	
130 135 140	
gga ctg cca cct gtg ccc act gac aac ggc gga tat ttc gac caa gcc	1138
Gly Leu Pro Pro Val Pro Thr Asp Asn Gly Gly Tyr Phe Asp Gln Ala	
145 150 155 160	
aca ttc aat gag gcg ccg aat ttc cgt cga aac gcg atg gta gcg ctg	1186
Thr Phe Asn Glu Ala Pro Asn Phe Arg Arg Asn Ala Met Val Ala Leu	

31												32											
165						170						175											
gag gaa ctc	ggc atc cct	gtc gag ttc	tcc cac cat	gaa act	gca cct	1234																	
Glu Glu Leu	Gly Ile Pro	Val Glu Phe	Ser His His	Glu Thr	Ala Pro																		
180						185						190											
ggc cag caa	gaa atc gat	tta cgc cat	gcg gat	gcg ctc	acc atg gcc	1282																	
Gly Gln Gln	Glu Ile Asp	Leu Arg His	Ala Asp	Ala Leu	Thr Met Ala																		
195						200						205											
gac aac atc	atg acc ttc	cgc tac atc	atg aaa	cag gtg	gca agg gac	1330																	
Asp Asn Ile	Met Thr Phe	Arg Tyr Ile	Met Lys	Gln Val	Ala Arg Asp																		
210						215						220											
caa ggc gtt	ggg gca tca	ttt atg ccc	aag cca	ttc caa	gaa cat gca	1378																	
Gln Gly Val	Gly Ala Ser	Phe Met Pro	Lys Pro	Phe Gln	Glu His Ala																		
225						230						235											
ggc tcc gcc	atg cac acg	cac atg tcc	tta ttt	gag ggc	gal acc aac	1426																	
Gly Ser Ala	Met His Thr	His Met Ser	Leu Phe	Glu Gly	Asp Thr Asn																		
245						250						255											
gcg ttc cac	gat cca gac	gat tct tac	atg ctg	tcc aaa	acc gca aaa	1474																	
Ala Phe His	Asp Pro Asp	Asp Ser Tyr	Met Leu	Ser Lys	Thr Ala Lys																		
260						265						270											
cag ttc atc	gct gga atc	ttg cat cac	gct cca	gaa ttc	acc gct gtg	1522																	
Gln Phe Ile	Ala Gly Ile	Leu His His	Ala Pro	Glu Phe	Thr Ala Val																		
275						280						285											
acc aac cag	tgg gtc aat	tcc tac aaa	cgc atc	gtg tac	gga aac gaa	1570																	
Thr Asn Gln	Trp Val Asn	Ser Tyr Lys	Arg Ile	Val Tyr	Gly Asn Glu																		
290						295						300											
gct cca act	gcg gca acc	tgg ggt gta	tct aat	cgt tct	gcg ctg gtt	1618																	
Ala Pro Thr	Ala Ala Thr	Trp Gly Val	Ser Asn	Arg Ser	Ala Leu Val																		
305						310						315											
cgt gtt cct	acc tac cgt	ttg aat aag	gag gag	tcg cgc	cgg gtg gag	1666																	
Arg Val Pro	Thr Tyr Arg	Leu Asn Lys	Glu Glu	Ser Arg	Arg Val Glu																		
325						330						335											
gtg cgt ctt	cct gat acc	gct tgt aac	cca tat	ttg gcg	ttt tca gtg	1714																	
Val Arg Leu	Pro Asp Thr	Ala Cys Asn	Pro Tyr	Leu Ala	Phe Ser Val																		
340						345						350											
atg ctc ggc	gct ggt ttg	aaa ggt att	aaa gaa	ggt tat	gag ctc gac	1762																	
Met Leu Gly	Ala Gly Leu	Lys Gly Ile	Lys Glu	Gly Tyr	Glu Leu Asp																		
355						360						365											
gag cca gct	gag gac gat	atc tcc aac	ttg agc	ttc cgg	gaa cgt cgc	1810																	
Glu Pro Ala	Glu Asp Asp	Ile Ser Asn	Leu Ser	Phe Arg	Glu Arg Arg																		
370						375						380											
gcc atg ggc	tac aac gat	ctg cca aac	agc ctt	gat cag	gca ctg cgc	1858																	
Ala Met Gly	Tyr Asn Asp	Leu Pro Asn	Ser Leu	Asp Gln	Ala Leu Arg																		

33																34			
Glu	Gln	Ile	Thr	Pro	Trp	Glu	Leu	Arg	Asn	Asn	Leu	Asp	Tyr						
435						440				445									
gcactccaat	ggaaacccta	cggcgaccca	attgcgaccc	gataaaggag	gggagaagct														
atg	tca	gga	ccg	tta	aga	agt	gaa	cgt	aaa	gtc	gtt	ggc	ttt	gtc	aga				
Met	Ser	Gly	Pro	Leu	Arg	Ser	Glu	Arg	Lys	Val	Val	Gly	Phe	Val	Arg				
1		5				10				15									
gac	cca	ctg	cca	aaa	gtt	ggc	tct	tta	tgc	ctg	aaa	tct	gag	cat	gcc				
Asp	Pro	Leu	Pro	Lys	Val	Gly	Ser	Leu	Ser	Leu	Lys	Ser	Glu	His	Ala				
20				25				30											
caa	gca	gat	cta	gag	cat	ttg	ggc	tgg	cgc	aat	gtt	gag	tct	ttg	gat				
Gln	Ala	Asp	Leu	Glu	His	Leu	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Glu	Ser	Leu	Asp				
35				40				45											
ttg	ttg	tgg	ggc	ttg	tca	ggc	gca	ggc	gat	ccc	gat	gtc	gcg	ctg	aac				
Leu	Leu	Trp	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala	Gly	Asp	Pro	Asp	Val	Ala	Leu	Asn				
50		55				60													
ctt	ctt	att	cgg	ctg	tat	cag	gca	ctt	gaa	gca	atc	ggc	gag	gat	gct				
Leu	Leu	Ile	Arg	Leu	Tyr	Gln	Ala	Leu	Glu	Ala	Ile	Gly	Glu	Asp	Ala				
65		70				75				80									
cga	aac	gag	ctt	gat	caa	gag	att	cgc	cag	gat	gaa	gaa	cta	cga	gtc				
Arg	Asn	Glu	Leu	Asp	Gln	Glu	Ile	Arg	Gln	Asp	Glu	Glu	Leu	Arg	Val				
85				90				95											
cgc	ctt	ttt	gca	ttg	ttg	ggc	ggc	tcc	tgc	gct	gtc	ggc	gat	cac	ttg				
Arg	Leu	Phe	Ala	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Ala	Val	Gly	Asp	His	Leu				
100				105				110											
gtc	gcc	aat	cct	ttg	cag	tgg	aaa	ctc	tta	aaa	ctt	gat	gcg	cca	tgc				
Val	Ala	Asn	Pro	Leu	Gln	Trp	Lys	Leu	Leu	Lys	Leu	Asp	Ala	Pro	Ser				
115				120				125											
agg	gaa	gag	atg	ttt	cag	gcg	ctg	ctg	gaa	tct	gtg	aaa	gct	cag	cct				
Arg	Glu	Glu	Met	Phe	Gln	Ala	Leu	Leu	Glu	Ser	Val	Lys	Ala	Gln	Pro				
130				135				140											
gct	gtg	ctt	gag	gtt	gag	gat	ttc	agc	gat	gca	cac	aac	att	gcc	cga				
Ala	Val	Leu	Glu	Val	Glu	Asp	Phe	Ser	Asp	Ala	His	Asn	Ile	Ala	Arg				
145				150				155				160							
gac	gat	ttg	agc	acg	cct	ggc	ttt	tac	acg	gct	agt	gtt	acc	ggg	cct				
Asp	Asp	Leu	Ser	Thr	Pro	Gly	Phe	Tyr	Thr	Ala	Ser	Val	Thr	Gly	Pro				
165				170				175											
gaa	gca	gag	cga	gtc	ttg	aaa	tgg	act	tat	cgc	acg	ttg	ctg	acc	cgg				
Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Leu	Lys	Trp	Thr	Tyr	Arg	Thr	Leu	Leu	Thr	Arg				
180				185				190											
att	gct	gcg	cat	gat	tta	gcg	ggt	acc	tat	ccc	acc	gac	atg	cgg	aga				
Ile	Ala	Ala	His	Asp	Leu	Ala	Gly	Thr	Tyr	Pro	Thr	Asp	Met	Arg	Arg				
195				200				205											
aaa	ggc	ggc	gat	cct	gtt	ccg	ttt	agc	aca	gtg	acc	atg	cag	ctc	agc				
Lys	Gly	Gly	Asp	Pro	Val	Pro	Phe	Ser	Thr	Val	Thr	Met	Gln	Leu	Ser				
210				215				220											
gac	cta	gct	gat	gct	gct	ttg	act	gct	gct	tta	gct	gtg	gca	att	gcc				
Asp	Leu	Ala	Asp																

35	245	250	255	36
atg ggc aaa tgt ggc ggc cag gaa ttg aac tac att tca gat gtg gac				2881
Met Gly Lys Cys Gly Ala Gln Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Val Asp				
260	265	270		
gtg gtg ttt gtt gca gag ccg gca aac tct aaa tca aca cgc acc gca				2929
Val Val Phe Val Ala Glu Pro Ala Asn Ser Lys Ser Thr Arg Thr Ala				
275	280	285		
gca gag ctc att cgc atc ggt agc aac tcg ttc ttt gag gtg gat gca				2977
Ala Glu Leu Ile Arg Ile Gly Ser Asn Ser Phe Phe Glu Val Asp Ala				
290	295	300		
gca ctt cgc cca gaa ggt aaa agt ggc gct ctt gtg cgc tct ttg gat				3025
Ala Leu Arg Pro Glu Gly Lys Ser Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu Asp				
305	310	315	320	
tcc cat atg gcg tat tac aag cgc tgg gcg gaa acc tgg gaa ttt cag				3073
Ser His Met Ala Tyr Tyr Lys Arg Trp Ala Glu Thr Trp Glu Phe Gln				
325	330	335		
gca ctg ctg aaa gct cgt ccc atg acg ggt gat att gac ctt ggg cag				3121
Ala Leu Leu Lys Ala Arg Pro Met Thr Gly Asp Ile Asp Leu Gly Gln				
340	345	350		
tcc tat gtg gat gct ctt tca ccg ttg att tgg gcg gct agc cag cgg				3169
Ser Tyr Val Asp Ala Leu Ser Pro Leu Ile Trp Ala Ala Ser Gln Arg				
355	360	365		
gaa tca ttt gtc aca gat gtc caa gct atg cgc cgt cga gtg ttg gac				3217
Glu Ser Phe Val Thr Asp Val Gln Ala Met Arg Arg Arg Val Leu Asp				
370	375	380		
aat gtt ccg gaa gac ttg cgt gat cgt gag ctg aag ctt ggt cgc ggt				3265
Asn Val Pro Glu Asp Leu Arg Asp Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Gly				
385	390	395	400	
ggt ttg agg gat gtg gag ttt gct gtc cag ctc ctt cag atg gtg cat				3313
Gly Leu Arg Asp Val Glu Phe Ala Val Gln Leu Leu Gln Met Val His				
405	410	415		
ggt cgc att gat gag acg ttg cgg gtt cgg tca acg gta aat gct ttg				3361
Gly Arg Ile Asp Glu Thr Leu Arg Val Arg Ser Thr Val Asn Ala Leu				
420	425	430		
cat gtg ttg gtt gat cag gga tat gtg ggt cgt gaa gac ggg cat aat				3409
His Val Leu Val Asp Gln Gly Tyr Val Gly Arg Glu Asp Gly His Asn				
435	440	445		
ctc att gag tcg tat gag ttt ttg cgc ctg ttg gag cat cgc ctt caa				3457
Leu Ile Glu Ser Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Leu Glu His Arg Leu Gln				
450	455	460		
ttg gag cgg atc aag cgc act cac ttg tta ccg aaa cct gat gac cga				3505
Leu Glu Arg Ile Lys Arg Thr His Leu Leu Pro Lys Pro Asp Asp Arg				
465	470	475	480	
atg aat atg cgc tgg ttg gcg cgc gct tct ggg ttt act ggt tcg atg				3553
Met Asn Met Arg Trp Leu Ala Arg Ala Ser Gly Phe Thr Gly Ser Met				
485	490	495		
gag caa agt tcg gcc aaa gct atg gaa cgg cat ttg cgt aag gtt cgt				3601
Glu Gln Ser Ser Ala Lys Ala Met Glu Arg His Leu Arg Lys Val Arg				
500	505	510		
ttg cag att cag tcg ttg cat agt cag ctg ttt tat cgg cca ctg ctg				3649

37	38
Leu Gln Ile Gln Ser Leu His Ser Gln Leu Phe Tyr Arg Pro Leu Leu	
515 520 525	
aac tct gtg gtc aac ttg agc gcg gat gcc atc aga ttg tct ccg gat	3697
Asn Ser Val Val Asn Leu Ser Ala Asp Ala Ile Arg Leu Ser Pro Asp	
530 535 540	
gct gca aag cta caa ttg ggg gca ttg gga tac ctg cat cca tca cgt	3745
Ala Ala Lys Leu Gln Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu His Pro Ser Arg	
545 550 555 560	
gct tat gaa cac ctg act gct ctt gca tca gga gct agc cgt aaa gcc	3793
Ala Tyr Glu His Leu Thr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Ser Arg Lys Ala	
565 570 575	
aag att cag gcg atg ttg ctg ccc acg ttg atg gag tgg ctg tct caa	3841
Lys Ile Gln Ala Met Leu Leu Pro Thr Leu Met Glu Trp Leu Ser Gln	
580 585 590	
aca gct gaa cca gat gcg gga ttg ctg aat tac cgc aag ctt tct gat	3889
Thr Ala Glu Pro Asp Ala Gly Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Leu Ser Asp	
595 600 605	
gct tcc tat gat cgc agc tgg ttt ttg cgc atg ctg cgt gat gag ggc	3937
Ala Ser Tyr Asp Arg Ser Trp Phe Leu Arg Met Leu Arg Asp Glu Gly	
610 615 620	
gta gtg ggg cag cgg ttg atg cgt att ttg gga aat tct ccc tat att	3985
Val Val Gly Gln Arg Leu Met Arg Ile Leu Gly Asn Ser Pro Tyr Ile	
625 630 635 640	
tct gaa ctg att atc tcc act ccg gac ttt gtg aaa cag ctg ggt gat	4033
Ser Glu Leu Ile Ile Ser Thr Pro Asp Phe Val Lys Gln Leu Gly Asp	
645 650 655	
gcg gcg tct ggt cct aaa ttg ctt gct act gca ccg act cag gtt gtg	4081
Ala Ala Ser Gly Pro Lys Leu Leu Ala Thr Ala Pro Thr Gln Val Val	
660 665 670	
aaa gca atc aag gcg acg gtg tcg cgt cat gag tca cct gat cgg gcg	4129
Lys Ala Ile Lys Ala Thr Val Ser Arg His Glu Ser Pro Asp Arg Ala	
675 680 685	
atc cag gct gca cga tcg ctg agg agg cag gag ctg gca cgc att gcc	4177
Ile Gln Ala Ala Arg Ser Leu Arg Arg Gln Glu Leu Ala Arg Ile Ala	
690 695 700	
tct gct gat ttg ctg aac atg ctg act gtt cag gaa gta tgc caa agc	4225
Ser Ala Asp Leu Leu Asn Met Leu Thr Val Gln Glu Val Cys Gln Ser	
705 710 715 720	
ttg tca cta gtc tgg gat gcg gtg ttg gat gct gcc ttg gat gcg gaa	4273
Leu Ser Leu Val Trp Asp Ala Val Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ala Glu	
725 730 735	
atc cgt gct gca ctt aac gat cca cag aaa cca gat cag cct ctg gcc	4321
Ile Arg Ala Ala Leu Asn Asp Pro Gln Lys Pro Asp Gln Pro Leu Ala	
740 745 750	
aat att tct gtg atc ggc atg ggc cgt ttg ggt gga gca gaa ctt gga	4369
Asn Ile Ser Val Ile Gly Met Gly Arg Leu Gly Gly Ala Glu Leu Gly	
755 760 765	
tac ggt tct gat gcc gat gtg atg ttt gta tgc gag ccg gta gcc ggt	4417
Tyr Gly Ser Asp Ala Asp Val Met Phe Val Cys Glu Pro Val Ala Gly	
770 775 780	

39	40
gtg gaa gag cat gag gcc gtc aca tgg tct att gcg atc tgt gat tcc	4465
Val Glu Glu His Glu Ala Val Thr Trp Ser Ile Ala Ile Cys Asp Ser	
785 790 795 800	
atg cgg tcg agg ctt gcg cag cct tcc ggt gat cca cct ttg gag gtg	4513
Met Arg Ser Arg Leu Ala Gln Pro Ser Gly Asp Pro Pro Leu Glu Val	
805 810 815	
gat ctg ggg ctg cgt cct gaa ggg aga tct ggt gcg att gtg cgc acc	4561
Asp Leu Gly Leu Arg Pro Glu Gly Arg Ser Gly Ala Ile Val Arg Thr	
820 825 830	
gtt gat tcc tat gtg aag tac tac gaa aag tgg ggt gaa act tgg gag	4609
Val Asp Ser Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Trp Gly Glu Thr Trp Glu	
835 840 845	
att cag gcg ctg ctg agg gct gcg tgg gtt gct ggt gat cgt gag ctg	4657
Ile Gln Ala Leu Leu Arg Ala Ala Trp Val Ala Gly Asp Arg Glu Leu	
850 855 860	
ggc att aag ttc ttg gag tcg att gat cgt ttc cgc tac cca gtt gac	4705
Gly Ile Lys Phe Leu Glu Ser Ile Asp Arg Phe Arg Tyr Pro Val Asp	
865 870 875 880	
ggg gca acg cag gcg cag ctt cgt gaa gtt cgt cga att aag gcg agg	4753
Gly Ala Thr Gln Ala Gln Leu Arg Glu Val Arg Arg Ile Lys Ala Arg	
885 890 895	
gtg gat aat gag agg ctt ccg cgc ggg gct gat cga aat acc cat acc	4801
Val Asp Asn Glu Arg Leu Pro Arg Gly Ala Asp Arg Asn Thr His Thr	
900 905 910	
aag ctg ggt cgg gga gcg tta act gac atc gag tgg act gtg cag ttg	4849
Lys Leu Gly Arg Gly Ala Leu Thr Asp Ile Glu Trp Thr Val Gln Leu	
915 920 925	
ttg acc atg atg cat gct cat gag att ccg gag ctg cac aat acg tcg	4897
Leu Thr Met Met His Ala His Glu Ile Pro Glu Leu His Asn Thr Ser	
930 935 940	
acg ttg gaa gtt ctt gaa gtg ctg gaa aag cat cag att att aac cct	4945
Thr Leu Glu Val Leu Glu Val Leu Glu Lys His Gln Ile Ile Asn Pro	
945 950 955 960	
gtg cag gtg cag acg ctt cgg gaa gcg tgg ctg acg gca acg gct gct	4993
Val Gln Val Gln Thr Leu Arg Glu Ala Trp Leu Thr Ala Thr Ala Ala	
965 970 975	
agg aat gcg ctt gtg ctg gtc agg ggt aag aga tta gat cag tta cct	5041
Arg Asn Ala Leu Val Leu Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gln Leu Pro	
980 985 990	
act cct ggt ccg cac ctt gcg cag gtg gct ggt gcg tct ggt tgg gat	5089
Thr Pro Gly Pro His Leu Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Trp Asp	
995 1000 1005	
cca aat gag tac cag gag tat ttg gaa aac tat ctg aaa gtg acc agg	5137
Pro Asn Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Val Thr Arg	
1010 1015 1020	
aag agt cgt cag gtt gtt gat gaa gtc ttc tgg ggt gtg gac tct atg	5185
Lys Ser Arg Gln Val Val Asp Glu Val Phe Trp Gly Val Asp Ser Met	
1025 1030 1035 1040	
gag caa cgl gag ttt taggtagggt gtagggagccc caaagttgcg gaaaattgtt c	5241
Glu Gln Arg Glu Phe	

1045

caactaaggg actatatgta ggtgtggata acctaagtta atcttttgtg agcgtgagga 5301
 tttctctgag gaatctagac gcagattaac ttccgcttgg cagcgaccgg gataacaccg 5361
 cggttgcggc cagcgaggct cacaaggac accactatga caagcattat tgcaagcaac 5421
 agcgacctat cggaggagct gcgcaccac actgcgcggg cacatgaaga ggccgagcac 5481
 tcaacgttta tgaatgac 5500

【0122】

<210> 2

<211> 446

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 2

Met Asn Ser Glu Gln Glu Phe Val Leu Ser Ala Ile Glu Glu Arg Asp
 1 5 10 15
 Ile Lys Phe Val Arg Leu Trp Phe Thr Asp Ile Leu Gly His Leu Lys
 20 25 30
 Ser Val Val Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ala Leu Glu Glu Gly
 35 40 45
 Ile Gly Phe Asp Gly Ser Ala Ile Glu Gly Tyr Ala Arg Ile Ser Glu
 50 55 60
 Ala Asp Thr Ile Ala Arg Pro Asp Pro Ser Thr Phe Gln Val Leu Pro
 65 70 75 80
 Leu Glu Ala Gly Ile Ser Lys Leu Gln Ala Ala Arg Leu Phe Cys Asp
 85 90 95
 Val Thr Met Pro Asp Gly Gln Pro Ser Phe Ser Asp Pro Arg Gln Val
 100 105 110
 Leu Arg Arg Gln Val Gln Leu Ala Ala Asp Glu Gly Leu Thr Cys Met
 115 120 125
 Ile Ser Pro Glu Ile Glu Phe Tyr Leu Val Gln Ser Leu Arg Thr Asn
 130 135 140
 Gly Leu Pro Pro Val Pro Thr Asp Asn Gly Gly Tyr Phe Asp Gln Ala
 145 150 155 160
 Thr Phe Asn Glu Ala Pro Asn Phe Arg Arg Asn Ala Met Val Ala Leu
 165 170 175
 Glu Glu Leu Gly Ile Pro Val Glu Phe Ser His His Glu Thr Ala Pro
 180 185 190
 Gly Gln Gln Glu Ile Asp Leu Arg His Ala Asp Ala Leu Thr Met Ala
 195 200 205
 Asp Asn Ile Met Thr Phe Arg Tyr Ile Met Lys Gln Val Ala Arg Asp
 210 215 220
 Gln Gly Val Gly Ala Ser Phe Met Pro Lys Pro Phe Gln Glu His Ala
 225 230 235 240
 Gly Ser Ala Met His Thr His Met Ser Leu Phe Glu Gly Asp Thr Asn
 245 250 255
 Ala Phe His Asp Pro Asp Asp Ser Tyr Met Leu Ser Lys Thr Ala Lys
 260 265 270
 Gln Phe Ile Ala Gly Ile Leu His His Ala Pro Glu Phe Thr Ala Val
 275 280 285
 Thr Asn Gln Trp Val Asn Ser Tyr Lys Arg Ile Val Tyr Gly Asn Glu
 290 295 300

43
 Ala Pro Thr Ala Ala Thr Trp Gly Val Ser Asn Arg Ser Ala Leu Val
 305 310 315 320
 Arg Val Pro Thr Tyr Arg Leu Asn Lys Glu Glu Ser Arg Arg Val Glu
 325 330 335
 Val Arg Leu Pro Asp Thr Ala Cys Asn Pro Tyr Leu Ala Phe Ser Val
 340 345 350
 Met Leu Gly Ala Gly Leu Lys Gly Ile Lys Glu Gly Tyr Glu Leu Asp
 355 360 365
 Glu Pro Ala Glu Asp Asp Ile Ser Asn Leu Ser Phe Arg Glu Arg Arg
 370 375 380
 Ala Met Gly Tyr Asn Asp Leu Pro Asn Ser Leu Asp Gln Ala Leu Arg
 385 390 395 400
 Gln Met Glu Lys Ser Glu Leu Val Ala Asp Ile Leu Gly Glu His Val
 405 410 415
 Phe Glu Phe Phe Leu Arg Asn Lys Trp Arg Glu Trp Arg Asp Tyr Gln
 420 425 430
 Glu Gln Ile Thr Pro Trp Glu Leu Arg Asn Asn Leu Asp Tyr
 435 440 445

【0123】

<210> 3
 <211> 1045
 <212> PRT
 <213> Brevibacterium lactofermentum
 <400> 3
 Met Ser Gly Pro Leu Arg Ser Glu Arg Lys Val Val Gly Phe Val Arg
 1 5 10 15
 Asp Pro Leu Pro Lys Val Gly Ser Leu Ser Leu Lys Ser Glu His Ala
 20 25 30
 Gln Ala Asp Leu Glu His Leu Gly Trp Arg Asn Val Glu Ser Leu Asp
 35 40 45
 Leu Leu Trp Gly Leu Ser Gly Ala Gly Asp Pro Asp Val Ala Leu Asn
 50 55 60
 Leu Leu Ile Arg Leu Tyr Gln Ala Leu Glu Ala Ile Gly Glu Asp Ala
 65 70 75 80
 Arg Asn Glu Leu Asp Gln Glu Ile Arg Gln Asp Glu Glu Leu Arg Val
 85 90 95
 Arg Leu Phe Ala Leu Leu Gly Gly Ser Ser Ala Val Gly Asp His Leu
 100 105 110
 Val Ala Asn Pro Leu Gln Trp Lys Leu Leu Lys Leu Asp Ala Pro Ser
 115 120 125
 Arg Glu Glu Met Phe Gln Ala Leu Leu Glu Ser Val Lys Ala Gln Pro
 130 135 140
 Ala Val Leu Glu Val Glu Asp Phe Ser Asp Ala His Asn Ile Ala Arg
 145 150 155 160
 Asp Asp Leu Ser Thr Pro Gly Phe Tyr Thr Ala Ser Val Thr Gly Pro
 165 170 175
 Glu Ala Glu Arg Val Leu Lys Trp Thr Tyr Arg Thr Leu Leu Thr Arg
 180 185 190
 Ile Ala Ala His Asp Leu Ala Gly Thr Tyr Pro Thr Asp Met Arg Arg
 195 200 205

45

46

Lys Gly Gly Asp Pro Val Pro Phe Ser Thr Val Thr Met Gln Leu Ser
 210 215 220
 Asp Leu Ala Asp Ala Ala Leu Thr Ala Ala Leu Ala Val Ala Ile Ala
 225 230 235 240
 Asn Val Tyr Gly Glu Lys Pro Val Asp Ser Ala Leu Ser Val Ile Ala
 245 250 255
 Met Gly Lys Cys Gly Ala Gln Glu Leu Asn Tyr Ile Ser Asp Val Asp
 260 265 270
 Val Val Phe Val Ala Glu Pro Ala Asn Ser Lys Ser Thr Arg Thr Ala
 275 280 285
 Ala Glu Leu Ile Arg Ile Gly Ser Asn Ser Phe Phe Glu Val Asp Ala
 290 295 300
 Ala Leu Arg Pro Glu Gly Lys Ser Gly Ala Leu Val Arg Ser Leu Asp
 305 310 315 320
 Ser His Met Ala Tyr Tyr Lys Arg Trp Ala Glu Thr Trp Glu Phe Gln
 325 330 335
 Ala Leu Leu Lys Ala Arg Pro Met Thr Gly Asp Ile Asp Leu Gly Gln
 340 345 350
 Ser Tyr Val Asp Ala Leu Ser Pro Leu Ile Trp Ala Ala Ser Gln Arg
 355 360 365
 Glu Ser Phe Val Thr Asp Val Gln Ala Met Arg Arg Arg Val Leu Asp
 370 375 380
 Asn Val Pro Glu Asp Leu Arg Asp Arg Glu Leu Lys Leu Gly Arg Gly
 385 390 395 400
 Gly Leu Arg Asp Val Glu Phe Ala Val Gln Leu Leu Gln Met Val His
 405 410 415
 Gly Arg Ile Asp Glu Thr Leu Arg Val Arg Ser Thr Val Asn Ala Leu
 420 425 430
 His Val Leu Val Asp Gln Gly Tyr Val Gly Arg Glu Asp Gly His Asn
 435 440 445
 Leu Ile Glu Ser Tyr Glu Phe Leu Arg Leu Leu Glu His Arg Leu Gln
 450 455 460
 Leu Glu Arg Ile Lys Arg Thr His Leu Leu Pro Lys Pro Asp Asp Arg
 465 470 475 480
 Met Asn Met Arg Trp Leu Ala Arg Ala Ser Gly Phe Thr Gly Ser Met
 485 490 495
 Glu Gln Ser Ser Ala Lys Ala Met Glu Arg His Leu Arg Lys Val Arg
 500 505 510
 Leu Gln Ile Gln Ser Leu His Ser Gln Leu Phe Tyr Arg Pro Leu Leu
 515 520 525
 Asn Ser Val Val Asn Leu Ser Ala Asp Ala Ile Arg Leu Ser Pro Asp
 530 535 540
 Ala Ala Lys Leu Gln Leu Gly Ala Leu Gly Tyr Leu His Pro Ser Arg
 545 550 555 560
 Ala Tyr Glu His Leu Thr Ala Leu Ala Ser Gly Ala Ser Arg Lys Ala
 565 570 575
 Lys Ile Gln Ala Met Leu Leu Pro Thr Leu Met Glu Trp Leu Ser Gln
 580 585 590
 Thr Ala Glu Pro Asp Ala Gly Leu Leu Asn Tyr Arg Lys Leu Ser Asp
 595 600 605

47

48

Ala Ser Tyr Asp Arg Ser Trp Phe Leu Arg Met Leu Arg Asp Glu Gly	
610	615 620
Val Val Gly Gln Arg Leu Met Arg Ile Leu Gly Asn Ser Pro Tyr Ile	
625	630 635 640
Ser Glu Leu Ile Ile Ser Thr Pro Asp Phe Val Lys Gln Leu Gly Asp	
	645 650 655
Ala Ala Ser Gly Pro Lys Leu Leu Ala Thr Ala Pro Thr Gln Val Val	
	660 665 670
Lys Ala Ile Lys Ala Thr Val Ser Arg His Glu Ser Pro Asp Arg Ala	
	675 680 685
Ile Gln Ala Ala Arg Ser Leu Arg Arg Gln Glu Leu Ala Arg Ile Ala	
	690 695 700
Ser Ala Asp Leu Leu Asn Met Leu Thr Val Gln Glu Val Cys Gln Ser	
705	710 715 720
Leu Ser Leu Val Trp Asp Ala Val Leu Asp Ala Ala Leu Asp Ala Glu	
	725 730 735
Ile Arg Ala Ala Leu Asn Asp Pro Gln Lys Pro Asp Gln Pro Leu Ala	
	740 745 750
Asn Ile Ser Val Ile Gly Met Gly Arg Leu Gly Gly Ala Glu Leu Gly	
	755 760 765
Tyr Gly Ser Asp Ala Asp Val Met Phe Val Cys Glu Pro Val Ala Gly	
	770 775 780
Val Glu Glu His Glu Ala Val Thr Trp Ser Ile Ala Ile Cys Asp Ser	
785	790 795 800
Met Arg Ser Arg Leu Ala Gln Pro Ser Gly Asp Pro Pro Leu Glu Val	
	805 810 815
Asp Leu Gly Leu Arg Pro Glu Gly Arg Ser Gly Ala Ile Val Arg Thr	
	820 825 830
Val Asp Ser Tyr Val Lys Tyr Tyr Glu Lys Trp Gly Glu Thr Trp Glu	
	835 840 845
Ile Gln Ala Leu Leu Arg Ala Ala Trp Val Ala Gly Asp Arg Glu Leu	
	850 855 860
Gly Ile Lys Phe Leu Glu Ser Ile Asp Arg Phe Arg Tyr Pro Val Asp	
865	870 875 880
Gly Ala Thr Gln Ala Gln Leu Arg Glu Val Arg Arg Ile Lys Ala Arg	
	885 890 895
Val Asp Asn Glu Arg Leu Pro Arg Gly Ala Asp Arg Asn Thr His Thr	
	900 905 910
Lys Leu Gly Arg Gly Ala Leu Thr Asp Ile Glu Trp Thr Val Gln Leu	
	915 920 925
Leu Thr Met Met His Ala His Glu Ile Pro Glu Leu His Asn Thr Ser	
	930 935 940
Thr Leu Glu Val Leu Glu Val Leu Glu Lys His Gln Ile Ile Asn Pro	
945	950 955 960
Val Gln Val Gln Thr Leu Arg Glu Ala Trp Leu Thr Ala Thr Ala Ala	
	965 970 975
Arg Asn Ala Leu Val Leu Val Arg Gly Lys Arg Leu Asp Gln Leu Pro	
	980 985 990
Thr Pro Gly Pro His Leu Ala Gln Val Ala Gly Ala Ser Gly Trp Asp	
	995 1000 1005

49

50

Pro Asn Glu Tyr Gln Glu Tyr Leu Glu Asn Tyr Leu Lys Val Thr Arg
 1010 1015 1020
 Lys Ser Arg Gln Val Val Asp Glu Val Phe Trp Gly Val Asp Ser Met
 1025 1030 1035 1040
 Glu Gln Arg Glu Phe
 1045

【0124】

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 4

ggggtcgacg gatcgacagg taatgcatt

29

【0125】

<210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 5

ggggtcgacg gatccacat gatggagga

29

【0126】

<210> 6
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 6

cttcccagta gcaccatacg ac

22

【0127】

40

<210> 7
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial/Unknown
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> ()..()
 <223> Description of Artificial Sequence: primer
 <400> 7

ctggggcag ttccaagagg tccttg

26

	51	52
【0128】	<210> 8 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 8 ggacaaggac ctcttcgaac tgccag	26
【0129】	<210> 9 <211> 26 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 9 cggcgagacc gtcgattggg aggagc	26
【0130】	<210> 10 <211> 22 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 10 gtagcacctt acgaccaaac cg	22
【0131】	<210> 11 <211> 20 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 11 ggagccggtc gacgaggagc	20
【0132】	<210> 12 <211> 25 <212> DNA	

	53	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 12	
	gctagcctcg ggagctctct aggag	25
【0133】		
	<210> 13	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 13	
	gatctttccc agactctggc cacgc	25
【0134】		
	<210> 14	
	<211> 17	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 14	
	cagttgtggc tgcaccg	17
【0135】	30	
	<210> 15	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 15	
	ctttccaga ctctggcc	18
【0136】		
	<210> 16	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Artificial/Unknown	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> ()..()	
	<223> Description of Artificial Sequence: primer	
	<400> 16	

	55		56
	cgctgctata attgaacgtg ag		22
【0137】	<210> 17 <211> 44 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 17		
	ctttgttgcc atatctgtgc gacgctgcta taattgaacg tgag		44
【0138】	<210> 18 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 18		
	ccaccacgaa gtcggtggcg g		23
【0139】	<210> 19 <211> 21 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..() <223> Description of Artificial Sequence: primer <400> 19		
	ttggagcctc gaagcctgga a		21
【0140】	<210> 20 <211> 29 <212> DNA <213> Brevibacterium flavum <400> 20		
	tggtcatatc tgtgcgacgc tgccataat		29
【0141】	<210> 21 <211> 29 <212> DNA <213> Artificial/Unknown <220> <221> misc_feature <222> ()..()		

57

58

<223> Description of Artificial Sequence: sequence of promoter

<400> 21

tggtcatatc tgtgcgacgc tgctataat

29

【0142】

<210> 22

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> (..)()

<223> Description of Artificial Sequence: sequence of promoter

<400> 22

tgccatattc tgtgcgacgc tgctataat

29

【0143】

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> (..)()

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 23

agacctacga gtccgccttt ttg

23

【0144】

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<221> misc_feature

<222> (..)()

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 24

cgatcaccag caaccacgc a

21

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

キーワード (参考)

C 1 2 R 1:15)

C 1 2 N 15/00

Z N A A

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:15)

(C 1 2 N 9/12

C 1 2 R 1:13)

(C 1 2 P 13/14
C 1 2 R 1:15)
(C 1 2 P 13/14
C 1 2 R 1:13)

(72)発明者 泉井 裕
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内
(72)発明者 川嶋 伸樹
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素
株式会社川崎工場内
(72)発明者 中松 亘
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内

(72)発明者 倉橋 修
神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1-1 味の素
株式会社発酵技術研究所内
F ターム(参考) 4B024 AA05 BA10 BA74 CA04 DA05
EA04 FA13 GA14
4B050 CC03 DB02 LL02 LL05
4B064 AE19 CA19 CA21 CC24 DA10
4B065 AA24X AA24Y AA27X AA27Y
AB01 BA02 CA17 CA29 CA41